

Title	Nodal antagonists regulate migration of the visceral endoderm along the future anteroposterior axis of the mouse embryo
Author(s)	山本, 正道
Citation	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/45368
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	やまもと まさみち 山 本 正 道
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 5 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Nodal antagonists regulate migration of the visceral endoderm along the future anteroposterior axis of the mouse embryo (Nodal 阻害因子がマウス胚の前後軸に沿って visceral endoderm の移動を制御している)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 濱田 博司 (副査) 教 授 近藤 寿人 教 授 平野 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】マウス発生段階において前後（頭尾）軸形成は重要なボディプラン現象の一つである。形態的に前後の区別が確認できるようになるのは受精後 6.5 日（6.5 日胚）である。遠近軸に沿って放射相称性を示す胚の将来後（尾）部側になる部分に原条が形成されるのである。しかし、これに先立ち分子レベルでは遠位臓側内胚葉（DVE）/前側臓側内胚葉（AVE）が前後軸形成に必須の役割を果たすことが明らかになっている。ホメオボックス遺伝子 *Hex* を発現する DVE は 5.5 日胚において胚遠位端に位置し、原条形成が開始される 6.5 日胚にかけて将来の胚前方に移動し AVE となる。*Lefty1*、*Cerberus-related* といった Nodal シグナルを抑制する分泌因子（Nodal 阻害因子）が AVE で発現している。これらの阻害因子はエピプラストに作用し、それまで胚体全体で発現していた Nodal を後側へ限局させる。このことにより前側エピプラストは将来の頭部を形成し、後側エピプラストは原条を形成する。

このように AVE がエピプラストに作用していることはわかってきたが、DVE がどのようにして将来の前側を決定して移動していくのかは未だに解明されていない。本研究ではこの疑問を解明する。

【方法ならびに成績】前後軸形成が行われる間（5.5 から 6.5 日胚）での Nodal 阻害因子の発現パターンを whole mount *in situ* hybridization 法を用いて詳細に調べた。すると *Hex* を発現する DVE がまだ遠位端に存在する時点で既に Nodal 阻害因子の *Lefty1* と *Cerberus-related* の発現は臓側内胚葉の遠位で一方向に傾いていた。

まず、この一方向に傾いている Nodal 阻害因子が DVE の移動方向を決定しているのかを調べた。DVE が移動し始める以前の 5.2 日胚を用いて遠位端近傍の臓側内胚葉側面に様々な遺伝子を異所発現させ、DVE が移動し終わる 6.5 日胚まで *in vitro* で培養を行い異所発現させた部位と DVE が移動した部位（前側）の関係を調べた。コントロールの GFP のみを発現させても発現部位と前側との関係はランダムであった。しかし、*Lefty1* と *Cerberus-related* を共発現させると発現させた部位はほとんど前側と一致した。また、*Nodal* を発現させると発現させた部位はほとんど前側以外となった。これより Nodal 阻害因子の一方向への傾きが DVE の移動方向を決定していることが明らかとなった。

次に前側を決定した後にはどのように DVE は移動していくのかを調べた。まず細胞増殖を BrdU 取り込み実験法を

用いて詳細に調べた。DVE が移動を行う直前の 5.5 日胚では細胞増殖は対称であったが、DVE の移動が始まる 5.7 日胚以降になると細胞増殖は DVE の位置で抑制され、胚の前後軸に沿って前側では抑制され、後方では促進させていると言った非対称であった。一方、DVE 移動がおこらない *Nodal* シグナルの変異マウス胚ではこの細胞増殖の非対称性は観察されなかった。これより細胞増殖の前後軸に沿った非対称性が DVE を一方向に移動させる原動力になっていると示唆された。

そこで、この細胞増殖の非対称性を形成しているものが *Nodal* とその阻害因子である事を確かめるため、これら遺伝子を異所発現させた臓側内胚葉の増殖率を調べた。予想通り *Nodal* は細胞増殖を促進させ、その阻害因子は細胞増殖を抑制した。

細胞増殖と DVE の前側への移動を更に裏付けるため、細胞増殖促進因子 *Cdk2* と細胞増殖を抑制するドミナントネガティブ型 *Cdk2* を用いて同様の異所発現実験を行った。すると *Nodal* やその阻害因子より効力は弱い *Cdk2* を異所発現させた臓側内胚葉は前側以外、ドミナントネガティブ側 *Cdk2* を異所発現させた臓側内胚葉は前側になる傾向が得られた。

最後に前後軸形成期における *Lefty1* と *Creberus-related* の二重変異マウスを調べた。このマウス胚では *Nodal* 阻害因子が欠損しているため *Nodal* の発現が亢進しており、そのため細胞増殖も亢進し、DVE の移動時期が遅れていた。時期が遅れながらも移動した理由としては DVE で野生型では発現しない *Nodal* 阻害因子の *Lefty2* が異所発現し、細胞増殖を DVE で抑制したためと考えられた。

【総括】 *Nodal* 阻害因子が遠位端から一方向へ傾いている事により DVE の移動方向を決定している。また *Nodal* 阻害因子が *Nodal* シグナルを抑制する事によって、前後軸に沿った非対称な細胞増殖を引き起こし DVE を移動させていることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

マウス発生段階において前後（頭尾）軸形成は重要なボディープラン現象の一つである。分子レベルでは遠位臓側内胚葉（DVE）/前側臓側内胚葉（AVE）が前後軸形成に必須の役割を果たすことが明らかになっている。DVE は受精後 5.5 日胚において胚遠位端に位置し、原条形成が開始される 6.5 日胚にかけて将来の胚前方に移動し AVE となる。しかし、DVE がどのようにして将来の前側を決定して移動していくのかは未だに解明されていなかった。

今回の研究によって、*Nodal* 阻害因子が遠位端から一方向へ傾いている事により DVE の移動方向を決定しているが明らかとなった。また *Nodal* 阻害因子が *Nodal* シグナルを抑制する事によって、前後軸に沿った非対称な細胞増殖を引き起こし DVE を移動させていることが明らかになった。

この研究はマウスの前後軸形成メカニズム解明に大きく貢献し、生物学に大きなインパクトを与え、*Nature* 誌に掲載されることになったため、この研究は学位の授与に値するものと認める。